

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520121153135

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**辛伐他汀通过胰岛素受体介导的  
IRS-1/PI3K/Akt 信号通路抑制小鼠骨骼肌  
葡萄糖代谢**

**Simvastatin inhibit glucose uptake through insulin receptor  
dependent IRS-1/PI3K/Akt pathway in mouse myotubes**

梁晓静

指导教师姓名: 李卫华 教授

专 业 名 称: 心血管内科

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2007 年 7 月

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

他汀类药物是羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶抑制剂,可竞争性抑制内源性胆固醇的合成。大量研究表明长期服用他汀类药物可增加新发糖尿病的发病风险,但具体机制尚不清楚。

本实验使用辛伐他汀及胆固醇代谢中间产物甲羟戊酸内酯干预小鼠骨骼肌细胞(由小鼠成肌细胞 C2C12 细胞分化而来),采用免疫印迹法(immunoblotting)、流式细胞术、细胞毒性试验和葡萄糖消耗试验,研究辛伐他汀和甲羟戊酸内酯对骨骼肌细胞葡萄糖代谢的影响及其作用机制。实验结果表明辛伐他汀可以减少骨骼肌细胞对葡萄糖的吸收,且该作用可被甲羟戊酸所逆转。机制研究结果表明:辛伐他汀对骨骼肌细胞葡萄糖吸收的抑制作用,可能与胰岛素受体(IR)、胰岛素受体底物 1(IRS-1)、蛋白激酶 B(PKB,也称为 Akt)的磷酸化水平下调以及细胞中葡萄糖转运体 4(GLUT4)的转位发生抑制有关。

综上,本实验研究结果表明辛伐他汀可损害胰岛素受体介导的 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路,进而导致骨骼肌细胞对葡萄糖的吸收减少,为深入研究他汀类药物导致的胰岛素抵抗以及新发糖尿病的相关机制研究提供了新的视野及方向。

**关键字:** 辛伐他汀, 骨骼肌, 胰岛素信号通路, 新发糖尿病

厦门大学博硕士论文摘要库



## Abstract

Simvastatin is an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase, which inhibits the synthesis of endogenous cholesterol. Numerous studies demonstrate that statins increase the risk of new-onset diabetes in long-term therapy, but underlying the pathological effects is still unclear. In our study, mouse muscle cell C2C12 cells were differentiated and treated with simvastatin in presence or absence of the mevalonolactone, and then western-blotting, flow cytometry, cytotoxicity assay and glucose kit method were performed. These studies showed that simvastatin could significantly reduced glucose uptake, whereas its effects were reversed by mevalonate. Mechanistic studies demonstrated that simvastatin inhibited the phosphorylation of IR, IRS-1 and Akt, and the translocation of GLUT4. Collectively, our findings indicate that simvastatin inhibits IR-dependent IRS-1/PI3K/Akt pathway, leading to suppress glucose uptake. These results provide an important new insight into the mechanism of statins on insulin sensitivity which may be associated with new-onset diabetes.

**Keywords:** Simvastatin; myotubes; IR-dependent IRS-1/PI3K/Akt pathway; new-onset diabetes

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

摘要中文.....	I
摘要英文.....	II
第一章 前 言.....	1
第二章 材料与方法.....	7
2.1 主要实验试剂.....	7
2.2 主要仪器和设备.....	9
2.3 主要试剂配制.....	11
2.4 细胞培养.....	14
2.4.1 小鼠成肌细胞(C2C12 细胞)的复苏.....	14
2.4.2 C2C12 细胞的培养及传代.....	14
2.4.3 C2C12 细胞的冻存.....	15
2.4.4 C2C12 细胞的分化.....	15
2.5 时间点确定(葡萄糖氧化酶法测定不同时间点的葡萄糖浓度).....	16
2.5.1 待测样品准备.....	16
2.5.2 工作液的配制.....	16
2.5.3 葡萄糖氧化酶法的反应条件.....	17
2.5.4 各组反应体系的配制.....	17
2.6 辛伐他汀对骨骼肌细胞的影响.....	17
2.6.1 待测样品准备.....	17
2.6.2 葡萄糖氧化酶法测定不同浓度辛伐他汀对骨骼肌细胞葡萄糖浓度的影响.....	18
2.6.3 CCK-8 法检测不同浓度辛伐他汀对骨骼肌细胞数目的影响(细胞毒性试验).....	18
2.7 辛伐他汀对胰岛素作用的影响.....	19
2.7.1 待测样品准备.....	19
2.7.2 葡萄糖氧化酶法测定不同浓度辛伐他汀对胰岛素作用的影响.....	20
2.7.3 统计分析.....	20
2.8 辛伐他汀对骨骼肌细胞中 GLUT4 转位到质膜的影响.....	21

2.8.1 待测样品准备.....	21
2.8.2 流式细胞术检测骨骼肌细胞中 GLUT4 转位到质膜的数目 ...	22
<b>2.9 辛伐他汀对骨骼肌细胞的 IR 介导的 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路的影响</b>	<b>22</b>
2.9.1 待测样品准备.....	22
2.9.2 细胞总蛋白的提取.....	23
2.9.3 BCA 法测定总蛋白浓度.....	24
2.9.4 蛋白质的变性.....	25
2.9.5 配胶.....	25
2.9.6 上样电泳.....	26
2.9.7 转膜.....	26
2.9.8 免疫反应.....	27
2.9.9 显影、定影.....	27
<b>第三章 实验结果.....</b>	<b>29</b>
3.1 辛伐他汀对骨骼肌细胞的影响.....	29
3.2 辛伐他汀抑制了胰岛素对骨骼肌细胞葡萄糖的吸收作用.....	31
3.3 辛伐他汀减少骨骼肌细胞中的 GLUT4 转位到质膜.....	31
3.4 辛伐他汀损害 IR 介导的 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路.....	33
<b>第四章 讨论与展望.....</b>	<b>36</b>
<b>英文缩略词表.....</b>	<b>44</b>
<b>参 考 文 献.....</b>	<b>46</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>52</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introductio.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter 2 Material and method.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Main reagent.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Main instruments and consumables.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Main reagent preparation method.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Cell Culture.....</b>	<b>14</b>
2.4.1 The recovery of mouse muscle cell line C2C12.....	14
2.4.2 The culture and subculture of C2C12.....	14
2.4.3 The cryopreservation of C2C12.....	15
2.4.4 The differentiation of C2C12.....	15
<b>2.5 Determine the time course for simvastatin-stimulated glucose uptake( the Glucose Kit method ).....</b>	<b>16</b>
2.5.1 The sample preparation.....	16
2.5.2 Preparation of the reagent.....	16
2.5.3 The glucose kit method reaction conditions.....	17
2.5.4 Preparation of reaction system.....	17
<b>2.6 Effect of simvastatin on skeletal muscle cells.....</b>	<b>17</b>
2.6.1 The sample preparation.....	17
2.6.2 The glucose kit method with different concentrations of simvastatin on skeletal muscle cells.....	18
2.6.3 Cell counting kit-8 assay with different concentrations of simvastatin on the impact of the number of skeletal muscle cells (cytotoxicity assay).....	18
<b>2.7 Effect of simvastatin on insulin action.....</b>	<b>19</b>
2.7.1 The sample preparation.....	19

2.7.2 The glucose kit method with different concentrations of simvastatin on insulin action.....	20
2.7.3 Statistical analysis.....	20
<b>2.8 Effect of simvastatin on GLUT4 translocation.....</b>	<b>21</b>
2.8.1 The sample preparation.....	21
2.8.2 Flow cytometrywith different concentrations of simvastatin on GLUT4 translocation.....	22
<b>2.9 Effect of simvastatin on IR-dependent IRS-1/PI3K/Akt pathway.....</b>	<b>22</b>
2.9.1 The sample preparation.....	22
2.9.2 Extraction of total cellular protein.....	23
2.9.3 BCA assay with concentrations of total protein.....	24
2.9.4 Protein denaturation.....	25
2.9.5 Preparation of the western blot.....	25
2.9.6Loading and electrophoresis.....	26
2.9.7 transfer to polyvinylidene difluoride membrane.....	26
2.9.8 Immune response.....	27
2.9.9Developing and fixing.....	27
<b>Chapter 3 Result.....</b>	<b>29</b>
3.1 Effect of simvastatin on skeletal muscle cells.....	29
3.2Simvastatin prevented insulin action in skeletal muscle cells.....	31
3.3Simvastatin decreased the translocation of GLUT4 in skeletal muscle cells.....	31
3.4 Simvastatin inhibited IR-dependent IRS-1/PI3K/Akt pathway.....	33
<b>Chapter 4 Discussion and overview.....</b>	<b>36</b>
<b>Abbreviation.....</b>	<b>44</b>
<b>References.....</b>	<b>46</b>

## 第一章 前言

他汀类药物即羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶抑制剂。它的化学结构与 HMG-CoA 相似, 且与 HMG-CoA 还原酶的亲和力较 HMG-CoA 高出数千倍, 因此可竞争性结合 HMG-CoA 还原酶并抑制其生物学作用, 从而阻断 HMG-CoA 的转化。HMG-CoA 转化的减少可使内源性胆固醇的合成减少。而细胞内游离胆固醇的减少会在转录水平减弱其对低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein, LDL)受体合成的抑制作用, 从而间接刺激 LDL 受体并导致受体密度的上调。LDL 受体密度的上调一方面可增加骨骼肌细胞对 LDL 的吸收, 引起血清 LDL 的减少; 另一方面, 上调的 LDL 受体密度可增加其与低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein-cholesterol, LDL-C)的结合, 从而增加 LDL 前体极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的降解, 使血浆中 VLDL 的水平下降。此外, 大剂量他汀药物的使用还能轻度降低血浆甘油三酯(triglyceride, TG)的水平。他汀类药物是迄今为止最为经典和有效的降脂药物, 广泛应用于高脂血症的临床治疗。目前常用的他汀类药物有: 洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀和阿托伐他汀。其中, 洛伐他汀和辛伐他汀是无活性的内酯环前药, 口服后经代谢转化为有活性的开环羟基衍生物。

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一组以动脉内膜脂质和纤维成分沉积, 平滑肌细胞及纤维组织增生, 并可伴有坏死及钙化为特征的慢性进行性疾病。病变主要累及主动脉、冠状动脉、脑动脉及肾动脉等中大型动脉, 并可引起病变处动脉管壁增厚、管腔狭窄及相应组织器官供血不足, 是导致冠心病、心肌梗死等心脑血管疾病的主要原因。动脉粥样硬化是由多种病因作用于不同环节所致, 其中脂质代谢异常是动脉粥样硬化最重要的危险因素。他汀类药物作为羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 可竞争性抑制内源性胆固醇的合成, 通过有效降低总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的表达进而减少粥样斑块的形成, 因此被广泛运用于血脂异常和心血管疾病的治疗<sup>[1,2]</sup>。

他汀类药物不仅具备调节血脂的作用, 还有延缓动脉粥样硬化的进展、稳定动脉壁上的硬化斑块, 改善血管内皮细胞功能及抗炎抗血栓等作用<sup>[3-6]</sup>。然而,

近年来,随着他汀类药物的广泛运用,其不良反应也日益增多,大量研究表明长期服用他汀类药物可增加新发糖尿病的发病风险<sup>[5,7]</sup>。

Naveed Sattar 等学者发表的 meta 分析发现,在入选的 13 项随机安慰剂或标准治疗对照研究中, 91140 位参与者中有 4278 位在 4 年内发展为糖尿病,其中他汀类药物治疗组的患者新发糖尿病的发病率较随机安慰剂组的患者增加 9% (比值比 OR 为 1.09; 95% 可信区间为 1.02 - 1.17)<sup>[5]</sup>。

Waters 等发表的强化降低胆固醇预防卒中研究结果表明,经过 4.9 年的随访,阿托伐他汀 80mg 组较安慰剂组新发糖尿病的风险增大((比值比 OR 为 1.44; 95% 可信区间为 1.14-1.83) <sup>[6]</sup>。

Ridker 等发表的关于瑞舒伐他汀疗效评估干预研究中, 17802 例观察对象在分别服用瑞舒伐他汀 20mg 和安慰剂进行一级预防后, 他汀组患者的新发糖尿病风险较安慰剂组患者增加了 25%<sup>[8]</sup>。

Abbas 等根据 2 型糖尿病的发病机制,把他汀类药物增加新发糖尿病的可能机制总结归纳为以下方面:  $\beta$  细胞分泌胰岛素异常和  $\beta$  细胞凋亡; 胰岛素敏感性下降; 葡萄糖摄取转运异常等<sup>[11]</sup>。目前已有他汀类药物作用于胰岛  $\beta$  细胞产生不良反应的相关研究, 如他汀类等药物可抑制胰岛  $\beta$  细胞的葡萄糖转运, 延迟胰岛  $\beta$  细胞内 ATP 的生成, 抑制胰岛  $\beta$  细胞钙通道依赖的胰岛素分泌过程, 甚至引起胰岛  $\beta$  细胞的凋亡等<sup>[9,10]</sup>。我们实验室的前期研究也进一步证明辛伐他汀可抑制 MIN6 细胞的胰岛素的合成以及分泌<sup>[11]</sup>。而在胰岛素敏感性下降、葡萄糖摄取转运异常方面, 目前研究集中在他汀类药物对胰岛素作用的外周主要靶器官 (如肝脏、骨骼肌和脂肪细胞) 等方面。尽管已有许多他汀类药物可引起肝脏的自身免疫<sup>[12,13]</sup>、抑制人骨骼肌细胞葡萄糖代谢<sup>[14]</sup>以及减少脂肪细胞表面的葡萄糖转运体 4(Glucose transporter type4, GLUT4) 的表达<sup>[15]</sup>等方面的相关研究, 然而, 他汀类药物增加新发糖尿病发病率的潜在机制仍不完善。

在外周靶器官中, 骨骼肌是在胰岛素刺激下葡萄糖代谢的主要外周组织, 也是人体最大的器官, 约占体重的 40%, 在维持人体血糖稳态中发挥重要作用。正常葡萄糖高胰岛素钳夹实验研究表明在高胰岛素状态下, 体内超过 80% 的葡萄糖在骨骼肌代谢<sup>[16]</sup>。

胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 介导的 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路是骨骼



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.